

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 57-168163

(43)Date of publication of application : 16.10.1982

(51)Int.Cl.

G01N 33/54
C08F212/06

(21)Application number : 56-052929

(71)Applicant : JAPAN SYNTHETIC RUBBER CO
LTD

(22)Date of filing : 10.04.1981

(72)Inventor : TAGAMI EIJIRO
YASUKAWA SHIRO
KAWAKAMI MARI
HIRAI HARUHIRO

(54) CARRIER FOR IMMUNOSEROLOGICAL INSPECTION REAGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a carrier which is stable and especially highly sensitive to optical measurement from a copolymer containing a specified amount of COOH on the surface thereof, prepared by polymerizing a mixture of an aromatic vinyl compound as a major component and an α , β -ethylenically unsaturated carboxylic acid as a minor component.

CONSTITUTION: A monomer mixture of 97W99wt% aromatic vinyl compound, 1W 3wt% of α , β -ethylenically unsaturated caboxylic acid and othe ethylenically unsaturated compounds (e.g., an acrylate ester, acrylonitrile) is emulsion-polymerized using a proper amount of alkyl mercaptan as a polymerization initiator to form a polymer latex with an average particle diameter of about 0.5W0.7 μ containing 0.01W0.3meq/g of COOH on the surface of a polymer particle. A sensitized latex is prepared in a PBS buffer solution with a concentration of the latex polymer particles of 0.25% and used for the agglutination reaction of a rheumatism factor in serum. The sensitized latex remains stable for several months with an excellent sensitivity.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

① 日本国特許庁 (JP)

① 特許出願公開

② 公開特許公報 (A)

昭57—168163

⑤ Int. Cl.³
G 01 N 33/54
C 08 F 212/06

識別記号

庁内整理番号
7906—2G
7016—4 J

④ 公開 昭和57年(1982)10月16日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

④ 免疫血清学的検査試薬用担体

相模原市上鶴間 8 丁目 17 番地 44 号

① 特 願 昭56—52929

② 発 明 者 平井晴弘

② 出 願 昭56(1981) 4 月 10 日

三重県三重郡菰野町大羽根園新
林町4443—50

⑦ 発 明 者 田上英二郎

① 出 願 人 日本合成ゴム株式会社

四日市市桜台 1 丁目 39 番地の 4

東京都中央区築地 2 丁目 11 番 24 号

⑦ 発 明 者 安川史郎

四日市市森カ山町 1 番地

④ 代 理 人 弁理士 山下穰平

⑦ 発 明 者 川上万里

明 細 書

1. 発明の名称

免疫血清学的検査試薬用担体

2. 特許請求の範囲

(1) 芳香族ビニル化合物を主成分とし、 α 、 β —エチレン性不飽和カルボン酸を少量含む単量体混合物を重合して得られる重合体粒子であつて、該重合体粒子表面に存在するカルボン酸基の量が 0.01 ~ 0.3 meq/g 重合体粒子であることを特徴とする重合体粒子からなる免疫血清学的検査試薬用担体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は免疫血清学的検査試薬用担体として有用な重合体粒子に関する。

抗原又は抗体などの血清学的活性物質を担体に吸着あるいは結合させて（以下本操作を感作と記す）免疫血清学的凝集反応若しくは凝集抑制反応を行い対応する抗体又は抗原などの存在を検査する免疫血清学的検査は簡便かつ鋭敏な方法であり広く利用されている。

免疫血清学的検査試薬としては妊娠診断テスト、リウマチ因子を検出する R A テスト、全身性紅斑性狼瘡を診断する L E テスト、慢性甲状腺炎を診断する T A テスト、C—反応性タンパクを検出する C R P テストなどのための多くの検査試薬が開発されている。

免疫血清学的検査試薬用担体としてポリスチレンなどの重合体粒子を用いることはよく知られたことである。さらにスルホン酸基、アミド基などの官能基で変性した重合体粒子も用いられている（例えば、特開昭55—131008号公報、特公昭56—9161号公報）。これらの重合体粒子に要求される性能としては抗原又は抗体などを重合体粒子に感作した状態のラテックス（以下感作ラテックスと記す）中の重合体粒子のコロイド化学的安定性と免疫血清学的凝集反応性が挙げられる。

しかし重合体粒子のコロイド化学的安定性を向上させると免疫血清学的凝集反応性は低

下し(感度の低下)、逆に免疫血清学的凝集反応性を高めるためにコロイド化学的安定性を低下させると非特異的に凝集し実用に供し得なくなる。このように互いに相反するコロイド化学的安定性と免疫血清学的凝集反応性とを同時に満足させる重合体粒子を得ることは従来極めて困難であった。

特に近年、免疫血清学的検査の分野において抗原又は抗体などの微量物質を定性的だけでなく定量的に測定することが重要な課題となつている。従来は感作ラテックスをガラス板上で検査対象物質と混合し反応させ、その重合体粒子の凝集状態を肉眼で観察することによつて検査目的物質を定性的に検出していたが、この凝集状態を肉眼で観察することの代りに光学的測定装置、例えば分光光度計、濁度計、弾性光散乱測定装置などを用いて測定することによつて定量的に検出しようとする試みが多くなされている。例えば感作ラテックス中の重合体粒子が凝集する現象を利

用して上澄液の濁度の減少率を測定する方法及び感作ラテックス中の重合体粒子の凝集による吸光度や散乱光を測定する方法などが知られている(CROATICA CHEMICA ACTA 42(1970)P. 457~466、Immunochimistry 12(1975)P349~351、特開昭53-24015、同54-109494など)。

これらの方法は感作ラテックス中の重合体粒子の免疫血清学的凝集反応による反応系の吸光強度、散乱光強度などの光学的特性の変化を測定することによつて定量化しようとするものであるが、いずれの方法も凝集反応による反応系の光学的特性の変化が小さいために精度、再現性などに問題があつた。また感作ラテックスの光学的特性の経時変化がしばしば起り、実用上支障を生じるといふ問題もあつた。

本発明者らは上記問題を改善すべく鋭意研究した結果、免疫血清学的検査試薬用担体と

して、特に光学的測定装置に適用する免疫血清学的検査試薬用担体として有用な重合体粒子を見出し本発明を完成した。

本発明の目的は良好なコロイド化学的安定性と免疫血清学的凝集反応性を具備し、特に凝集反応又は凝集抑制反応による反応系の光学的特性の変化を光学的測定装置により測定し、検査目的物質の定量的検出を良好な感度でもつて可能ならしめる免疫血清学的検査試薬用担体を提供することにある。

本発明に従つて、芳香族ビニル化合物を主成分とし、 α,β -エチレン性不飽和カルボン酸を少量含む単量体混合物を重合して得られる重合体粒子であつて、該重合体粒子表面に存在するカルボン酸基の量が0.01~0.3 meq./g 重合体粒子であることを特徴とする重合体粒子からなる免疫血清学的検査試薬用担体が提供される。

本発明は重合体粒子表面に存在するカルボン酸基の含有量が抗原-抗体反応に重要な影

響を及ぼすという知見にもとづくものであり、前記のように重合体粒子は非特異凝集しない程度に安定性を有しかつ免疫血清学的凝集反応性を備える必要がある。さらに凝集反応若しくは凝集抑制反応による反応系の吸光強度、散乱光強度などの光学的特性の変化が大きいことが重要である。これらの条件を満たすには重合体粒子表面のカルボン酸基が0.01~0.3 meq./g 重合体粒子、好ましくは0.03~0.2 meq./g 重合体粒子が必須である。また感作ラテックスを調製した場合の光学的特性の経時変化を考慮すると0.03~0.08 meq./g 重合体粒子が望ましい。カルボン酸基が0.01 meq./g 重合体粒子未満の場合は非特異凝集を起し易く、一方0.3 meq./g 重合体粒子を越えると凝集反応性が低下し感度が鈍くなる。

なお、本発明において記述する「重合体粒子表面に存在するカルボン酸基の量」はジョンヘンによつて開発された測定方法によつて

求めることができる (*Journal of Colloid and Interface Science*, 49 (3) 425, 1974)。

本発明の免疫血清学的検査試薬用担体である重合体粒子は芳香族ビニル化合物を主成分とし α,β -エチレン性不飽和カルボン酸を少量含有する単量体混合物を共重合した重合体粒子である。好ましい重合体粒子は、芳香族ビニル化合物36~99.5重量%、 α,β -エチレン性不飽和カルボン酸0.5~4重量%及び芳香族ビニル化合物以外のエチレン性不飽和化合物0~60重量%からなる単量体混合物を共重合した重合体粒子である。特に好ましくは、芳香族ビニル化合物96~99.5重量%と α,β -エチレン性不飽和カルボン酸0.5~4重量%よりなる共重合体であり、更に好ましくは芳香族ビニル化合物97~99重量%と α,β -エチレン性不飽和カルボン酸1~3重量%を共重合した重合体粒子である。

芳香族ビニル化合物としては例えばステレ

ン、 α -メチルスチレン、ビニルトルエン、ハロゲン化スチレンなどを挙げることができ、好ましくはスチレンである。これらの芳香族ビニル化合物を併用することもできる。

α,β -エチレン性不飽和カルボン酸としては例えばアクリル酸、メタクリル酸などのモノカルボン酸、イタコン酸、マレイン酸、フマル酸などのジカルボン酸、イタコン酸モノメチルエステル、マレイン酸モノラウリルエステルなどのジカルボン酸モノエステルなどがあり、これらを併用することもできる。好ましい α,β -エチレン性不飽和カルボン酸はメタクリル酸である。

芳香族ビニル化合物以外のエチレン性不飽和化合物としては例えばアクリル酸メチル、アクリル酸ブチル、アクリル酸2-エチルヘキシルなどのアクリル酸エステル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸ブチル、メタクリル酸ラウリルなどのメタクリル酸エステル、塩化ビニル、塩化ビニリデンなどのハロゲン

化ビニル化合物、アクリロニトリル、メタクリロニトリルなどのシアノエチレン化合物などを挙げるができる。

また、本発明の免疫血清学的検査試薬用担体である重合体粒子の粒子径は、特に限定するものではないが、通常粒子径分布は狭い方が望ましく、平均粒子径としては0.1~2 μ が好ましく、特に好ましくは0.3~1.5 μ である。

上記重合体粒子の製造方法は特に限定するものではないが、例えば芳香族ビニル化合物36~99.5重量%、 α,β -エチレン性不飽和カルボン酸0.5~4重量%及び芳香族ビニル化合物以外のエチレン性不飽和化合物0~60重量%からなる単量体混合物100重量部にアルキルメルカプタン0.2~2.0重量部を混合し、これを過硫酸塩0.1~5重量部、乳化剤0~0.5重量部を含む50~100℃の水中に3~20時間かけて連続的に又は逐次添加して重合する方法を挙げるができる。

この方法の実施態様を次に述べる。

単量体100重量部にアルキルメルカプタン0.2~2.0重量部を混合する際、単量体に一括混合してもよいし単量体の一部にアルキルメルカプタンを混合してアルキルメルカプタンを混合しない単量体と同時に連続的に又は逐次添加してもよい。

アルキルメルカプタンが0.2重量部未満の場合は重合中に多量の凝縮物が生成しやすく、2.0重量部を超える量を加えても重合中に凝縮物が生成しやすくなる。アルキルメルカプタンとしては例えばn-オクチルメルカプタン、n-デシルメルカプタン、n-ドデシルメルカプタンなどの長鎖アルキルメルカプタンがあり、アルキル基の炭素数は8~16が適当である。

過硫酸塩としては例えば過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウムなどを挙げるができる。使用量は0.1~5重量部が好ましい。0.1重量部未満では重合速

度が著しく遅くなる。5重量部を超えて用いると重合体粒子の粒子径分布が広くなり好ましくない。

重合温度は50～100℃が好ましく、特に60～90℃が好ましい。50℃未満の温度では重合速度が遅く重合体粒子の粒子径分布が広くなる傾向がある。

単量体とアルキルメルカプタンの混合物は連続的に又は逐次添加することが望ましい。混合物を3時間未満で添加し終ると、得られた重合体粒子を免疫血清学的検査試薬用担体として用いた場合、経時的に感度が低下しやすくなる。また滴下が20時間を超えると重合体粒子の粒子径分布が広くなる場合があり好ましくない。好ましくは10～15時間で連続的に又は逐次添加することである。

上記混合物の添加は重合溶液の液面上より滴下または流下して行なつてもよいし、また液面下より注入してもよい。また、混合物の添加は所定の時間内に均等にかつ連続的に行

なわれるが、場合により実質的に連続添加と見なし得る程度に間欠的にすなわち逐次添加してもよい。

また乳化剤は単量体100重量部当り0～0.5重量部が適当であり、重合体粒子の平均粒子径を制御する目的で用いる。0.5重量部を超えて用いると粒子径分布が広くなり好ましくない。好ましいのは0～0.1重量部であり特に好ましくは使用しないことである。

乳化剤としてはドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸アンモニウム、ドデシルジフェニルオキシサイドジスルホン酸ナトリウムなどの陰イオン乳化剤およびポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェノールエーテルなどの非イオン性乳化剤などを単独又は組合せて用いることができる。これらの内、特に好ましい乳化剤はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、ドデシルジフェニルオキシサイ

ドジスルホン酸ナトリウムである。

重合終了後に必要に応じて脱単量体のためのストリップングもしくは濃度調整のための希釈または濃縮を行なうことができる。

また、上記ラテックス中の重合体粒子を免疫血清学的検査試薬用担体として用いる場合通常感作前に遠心分離、限外濾過などの方法でラテックス中に混在する低分子量重合体や不純物を除去する操作を行なう。

本発明の免疫血清学的検査試薬用担体である重合体粒子は従来の重合体粒子と比較して感作ラテックスとした場合に感度が優れ、かつ経時的感度の低下の少なく、免疫血清学的検査試薬用担体として優れたものである。特に光学的測定装置を用いて第1表に例示するような検査目的物質を定性的および定量的に検出する免疫血清学的検査試薬用担体として好適である。

第 1 表

検査目的物質	検査目的物質の種類	担体に感作する物質の種類	免疫血清学的反応の種類
リウマチ因子	抗体	抗原	凝集反応
インフルエンザ抗体	抗体	抗原	凝集反応
C反応性タン白	抗原	抗体	凝集反応
エリスロポエチン	抗原	抗体	凝集抑制反応

なお本発明重合体粒子及び感作した重合体粒子は、通常水中に分散した状態、すなわちラテックス状態で保存するが、凍結乾燥しておいてもよい。凍結乾燥するためにはラテックスに安定剤として各種アミノ酸類、特にグリシン及びグルタミン酸ナトリウムをそれぞれ0.2～2重量部並びにデキストランを0.3～3重量部を加えて液体窒素あるいは液体窒素中などで急速凍結してから凍結乾燥する。

次に本発明の実施例を示す。なお実施例において部及び量は重量による。

実施例 1 及び比較例 1

重合体粒子の製造

攪拌機、冷却コイル、温度検出器、ジャケットなどを装備したステンレス製反応器（容量 5 L）を真空置換して蒸留水 150 部を仕込み、攪拌しながら温度を 80℃ にした。次に蒸留水 10 部に過硫酸カリウム 0.5 部を溶解して反応器に仕込み、続いて第 2 表に示した組成の単量体 100 部と所定量の 1-ドデシルメルカプタンの混合物を所定時間かけて反応器に連続的に添加した。単量体添加終了後、反応器の温度を 90℃ に上げさらに 3 時間重合させた。重合転化率は全て 98% 以上であった。

得られた重合体粒子ラテックスを水酸化ナトリウムで pH 9 に調整しスチームストリッピング及び減圧蒸留で残留未反応単量体を除去した。得られた重合体粒子の平均粒子径及び表面のカルボン酸基の量を第 2 表に示す。重合体粒子の粒子径は比較的揃っていた。

試料番号	実施例 1					比較例 1
	1	2	3	4	5	
単量体組成						
ステレン (%)	99	98	93	96	93	
アクリロニトリル (%)	—	—	5	—	—	
メタクリル酸 (%)	1	2	2	4	7	
1-ドデシルメルカプタン (部)	1.0	1.0	0.5	1.0	1.0	
添加時間 (時間)	8	12	10	10	10	
平均粒子径 (μ)	0.5	0.7	0.6	0.6	0.5	
表面のカルボン酸基の量 (mg/g)	0.08	0.06	0.04	0.25	0.43	

注 (1) 平均粒子径：電子顕微鏡像により求めた。

S : 重合体ラテックス中の重合体粒子の濃度 (%)

$$(W \times S = 10 \text{ g})$$

使用例 1

熱会合免疫グロブリン G 感作ラテックスの調製

1/15 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) 1 容と生理食塩液 3 容との混合液（以下 PBS と略す）に実施例 1 及び比較例 1 で得た試料番号 1～5 のラテックス並びに市販ラテックス (1) 及び (2) を重合体粒子の濃度が 0.25% になるように懸濁し、これに熱会合免疫グロブリン G の 200 μg/ml 液を等量加え、室温で 60 分間保ち、感作した。感作後 10,000 rpm、30 分遠心して重合体粒子を分取し、PBS で洗浄した後、希釈液（牛血清アルブミン 0.1% をふくむ PBS）に重合体粒子の濃度が 0.25% になるように懸濁して、熱会合免疫グロブリン G 感作ラテックスを得た。

備考：市販ラテックス (1) はダウケミカル社製

注 (2) 表面のカルボン酸基の量：前記ジョーンヘンによつて開発された測定方法によつて求めた。すなわち重合体粒子ラテックスを乾燥固形分で 10 g になるように採り蒸留水で 150 ml になるように希釈し、次いで水酸化ナトリウムで pH 11.5 ± 0.2 に調整し、0.1 N の硫酸を 3.43 ml/分の割合で滴下して電導度を経時的に測定する。試料番号 2 の電導度と硫酸滴定量の関係を示す曲線を第 1 図に図示する。

次に第 1 図のような電導度と硫酸滴定量の関係を示す曲線を用い次式によつて表面のカルボン酸基の量 (a) を求める。

$$a (\text{mg/g}) = \frac{V_{ab} \times N}{W \times S}$$

V_{ab} : 表面のカルボン酸ナトリウム塩を中和するのに必要な硫酸量 (ml)

N : 硫酸の規定度 ($N = \text{mg/ml}$)

W : 重合体ラテックス量 (g)

ポリスチレンラテックス

粒子径 0.33 μ 市販ラテックス(2) = 武田薬品工業(株)製
ラテックス、SDL-59リウマチ因子の測定

リウマチ因子陽性血清を10名分混合してブール血清を調製し、これをPBSで1:10、1:20、1:40、1:80、1:160及び1:320に希釈した。この希釈血清0.5 mlに1:25に希釈した前記感作ラテックスを0.5 ml加え、37℃で60分反応させた後分光光度計(日立製作所製モデル200-20型)を使用し吸光度を測定した。測定波長は400 nmを用いた。測定値は感作ラテックスにPBSのみ0.5 mlを加えたものの吸光度を基準にし、各希釈液の吸光度との差を求めた。結果を第2図に示す。第2図から明らかなように実施例1の試料番号1~4で得た重合体粒子を使用した感作ラテックスはリウマチ因子陽性血清の希釈率によつて吸光

度の差が大きく変化していることがわかる。これに対して比較例1の試料番号5並びに市販ラテックス(1)及び(2)を使用した感作ラテックスはリウマチ因子陽性血清の希釈率による吸光度の差が小さいことがわかる。

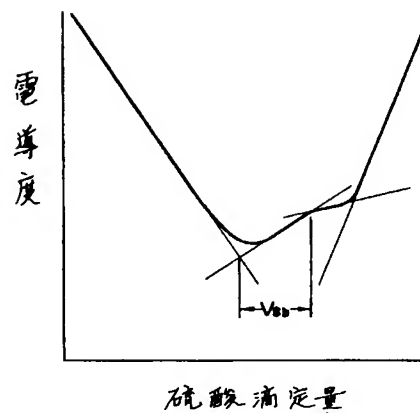
感作ラテックスの経時変化

前記の感作ラテックスを調整後、4ヶ月目及び6ヶ月目に再度上記と同様にしてリウマチ因子の測定を行なつた。この結果、実施例1の試料番号1~3の重合体粒子を用いた感作ラテックスは4ヶ月目、6ヶ月目も第2図と同様の結果が得られた。試料番号4の重合体粒子を用いた感作ラテックスは、4ヶ月目の測定では第2図と同様の結果が得られたが、6ヶ月目の測定では第2図とはやや異なつた結果になつた。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の重合体粒子において粒子表面に存在するカルボン酸基の量の測定のため電導度と硫酸滴定量との関係を示す。

第 1 図



第2図は感作ラテックスとリウマチ因子陽性血清との反応系の吸光度測定においてリウマチ因子陽性血清の希釈率と吸光度の差との関係を示す。

第 2 図

